Ueber den Abbau des Salepmannans durch die Fermente des Gerstenmalzes

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

GENEHMIGT

VON DER PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT

DER

FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT

ZU BERLIN.

Von

Alexander Genin

aus Riga.

Tag der Promotion: 6. August 1926

194

Referenten:

Professor Dr. **W. Schlenk**

Professor Dr. **A. Stock.**

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Allgemeiner Teil.

Der Salepschleim wird aus den Knollen der Orchidee Tubera Salep, gewonnen. Mit einer 15-fachen Menge Wasser extrahiert und von den aufgeschlämmten nichtlöslichen Bestandteilen zentrifugiert, wird die Lösung im Vakuum auf ein Fünftel ihres Volumens eingedampft und der Salepschleim mit Alkohol aus der schleimigen Lösung gefällt. Durch Zentrifugieren und Pressen des Niederschlages läßt sich eine hornartige weiße Masse gewinnen. Nach dieser von mir ausgearbeiteten Herstellungsweise wird das früher angewandte[1]) lästige Kolieren, das mehrmalige Pressen und Eindampfen in grossen Porzellanschalen umgangen und ein sauberes Präparat erhalten.

Dieser so gewonnene Salepschleim zeigt im wässriger wie auch in alkalischer Lösung optische Inaktivität[2]). Hiermit tritt er in Analogie zu einer anderen, neuerdings viel untersuchten Hemicellulose: dem Lichenin und zur Cellulose.

Ueber die chemische Charakteristik des Salepschleims liegen schon mehrere Arbeiten vor. So wurde er von Tollens und Gans[3]) mit Schwefelsäure bis zur Mannose hydrolysiert, durch Hilger[4]) als Polysaccharid erkannt, das ausschließlich aus Mannoseresten besteht, das also ebenso wie die aus Steinnuss gewonnene Hemicellulose — ein reines Mannan darstellt. Das Steinnussmannan[5]) unterscheidet sich von dem Salepmannan durch seine Unlöslichkeit in Wasser und optische Aktivität (—44,33°) in n-Natronlauge; während das Salepmannan ein Reservepolysaccharid ist, stellt das Steinnussmannan ein Gerüst-Polysaccharid, eine Mannocellulose[6]) dar. Ich hydrolysierte mittels 2,5%iger HCl und gelangte ebenfalls quantitativ bis zur Mannose von der charakteristischen spezifischen Drehung. Wie bei allen komplexen Polysacchariden wird Fehlingsche Lösung auch durch den Salepschleim nicht reduziert.

Da das Salepmannan bisher noch keinem fermentativen Abbau unterworfen wurde, stellte ich mir zur Aufgabe, die Wirkung einiger Fermente auf dieses Polysaccharids zu verfolgen. Ich untersuchte sein Verhalten gegenüber Emulsin und Pankreatin, wobei ich eine gewisse, wenn auch nicht weitgehende Einwirkung beider Fermentgemische auf das

---

1) Thamm. Ueber Salepschleim. Diss. München, 1903.)
2) Karrer u. Joos. Biochem. Z. 136, 537 — 41 (1923.
3) Tollens u. Gans. B. 21, 2150 (1888).
4) Hilger. B. 36, 3197 (1903).
E. Fischer u. Hirschberger. B. 22, 365 (1898).
5) H. Pringsheim u. Seifert. H. 123, 205 (1923).
6) H. Pringsheim. Die Polysaccharide. S. 187 (1923).

Substrat habe feststellen können; jedoch konnten diese Spaltungen wegen ihrer Geringfügigkeit nicht als Grundlage für weitere Untersuchungen dienen. Ich wandte mich hierauf dem Malzauszuge zu, in dem nach neueren Feststellungen ausser der schon bekannten Diastase noch mehrere Polyasen und Disaccharasen wie Lichenase und Cellobiase vorkommen.[7])

Ein Versuch, den ich mit einem frischen Malzauszuge angesetzt habe, zeigte nach 96 Stunden eine fast quantitative Spaltung des Salepmannans in Mannose.

Die Anwesenheit eines mannanspaltenden Ferments, das ich Mannanase nennen muss, im Malzauszuge war damit erwiesen.

Im allgemeinen beobachten wir beim enzymatischen Polysaccharidabbau keinen direkten Uebergang des komplexen Kohlehydrates in die Monosaccharide; es werden Zwischenstufen durchschritten, die meist der Disaccharidstufe angehören, z. B. bei der Stärke die Maltose, bei der Cellulose die Cellobiose usf.[8]). Auch im Falle des dem Salepmannan in manchen Beziehungen analogen Lichenins ist gezeigt worden, dass der Abbau bis zum Monosaccharid in mehreren Stufen verläuft,[9]) die durch mehrere spezifische Fermente gebildet werden. Hier war die Trennung der Fermente durch Altern gelungen, wobei die Disaccharase zerstört wurde. Es lag nahe, ähnliche Verhältnisse auch bei der fermentativen Spaltung des Salepmannans zu vermuten. Tatsächlich lieferte ein sechs Monate alter Malzauszug bei der Spaltung des Salepmannans ein Hydrolysat, das durch seine Reduktionskraft und die mangelnde Fähigkeit zur Glucosazonbildung auf die Anwesenheit eines Disaccharids schliessen liess. Interessanterweise besaß der Körper ebenso wie sein Konstituent, die Mannose, die Eigenschaft ein schwerlösliches Phenylhydrazon zu bilden. Dieser gutkristallisierte Körper konnte isoliert werden; er wurde durch seine Analyse als ein Disaccharidphenylhydrazon identifiziert. Ich nenne den neuen Zucker, der sich durch diese Reaktion mit Phenylhydrazin von allen bekannten Disacchariden unterscheidet und das erst bekanntgegebene natürliche Disaccharid aus zwei Mannosereten darstellt: Mannobiosé.

Mittels der Herzfeldschen[10]) Methode der Abspaltung des Phenylhydrazinrestes aus dem Hydrazon durch Kochen mit

---

7) K. Oppenheimer. Die Fermente und ihre Wirkungen, IV. Aufl.
H. Pringsheim u. Seifert. H. Bd. 128, 284 (1923).
8) H. Pringsheim. H. 78, 266 (1912).
9) H. Pringsheim u. J. Leibowitz. H. 131, 262 (1922).
H. Pringsheim u. W. Kusenack. H. 137, 265 (1924).
10) Herzfeld. B. 28, 442 (1895).

Benzaldehyd versuchte ich den freien Zucker rein zu gewinnen, was mir gelungen ist. Auch konnte die Mannobiose in Prismen zur Kristallisation gebracht werden. Ihre Drehung ist fast die gleiche wie die der Mannose, nämlich + 12,8°.

Es ist nicht ausgeschlossen, dass sie mit der Mannobiose identisch ist, die von Bourquelot und Herissey[11]) durch Fermentsynthese mit Hilfe der „Seminase", eines Fermentes aus Dattelkernen, gewonnen wurde, doch sind die Angaben dieser Autoren bezüglich der Drehung, die unter + 20° angegeben wurde, für eine definitive Identifizierung zu ungenau, zumal von ihnen kein Phenylhydrazon dargestellt wurde.

Durch meinen Versuch mit einem gealterten Malzauszuge war erwiesen, dass am totalen Abbau des Salepmannans mindestens zwei Fermente beteiligt sind: eine eigentliche Mannanase, die das Polysaccharid bis zur Disaccharidstufe abbaut, und eine „Mannobiase", die das Disaccharid spaltet. Durch einen Serienversuch wurde die Aktivitäts — p_H — Kurve der Mannanase ermittelt.
Ihr Optimum liegt bei $p_H = 5$ (Tabelle 1).

Zunächst war es mir nicht möglich, mich bei Wiederholung des Versuches in Besitz grösserer Mengen Mannobiose zu setzen; es zeigte sich nämlich im Laufe der weiteren Untersuchung, dass der Alterungsvorgang und die Inaktivierung der Mannobiase von Bedingungen abhängig sind, über die man noch vollständig im unklaren ist. Unter den Malzauszügen, die ich prüfte, fand ich mehrere, die nach neun Monate langem Altern, ja sogar nach 12 Monaten und 15 Monaten eine starke Disaccharid-spaltende Wirkung zeigten.

Deshalb musste ein Weg gefunden werden, um die Trennung der Polyasen von den Disaccharasen im allgemeinen, oder wenigstens in unserem Falle die Trennung der Mannanase von der Mannobiase, unabhängig von allen Zufälligkeiten durchführen zu können.

Um diesem Ziele näher zu kommen, untersuchte ich vor allen Dingen den Einfluß der Azidität auf den Alterungsvorgang. Für die praktische Durchführung dieser Versuche war es nötig auf empirischem Wege eine Tabelle aufzustellen, die es gestattet, von einer gegebenen Wasserstoffionenkonzentration durch Zusatz einer entsprechenden Menge bestimmter Pufferlösungen auf das erforderliche — in diesem Falle $p_H = 5$ — zu gelangen (Tabelle 9). Ein frischer Malzauszug wurde bei $p_H = 3, 4, 5, 6, 7$ und 37° 18 Tage altern gelassen, dann nach der eben erwähnten Tabelle auf $p_H = 5$ umgestellt und auf Stärke, Cellobiose und Mannan einwirken

---

[11]) Bourquelot u. Herrissey. J. Ph. et. Ch. (7), Bd. 21, S. 81 (1920).

gelassen. Es zeigte sich, dass die Mannanase und Gellobiase bei p_H-3 und 4 unwirksam geworden sind, während die Amylase noch schwach wirksam war; bei p_H = 6 und 7 verhielten sich alle Fermente resistenter. (Tabelle 2a, b, c).

Ein abweichendes Verhalten zwischen Polyasen und Disaccharasen im Altern bei verschiedener Azidität war durch diesen Versuch nicht nachgewiesen, so dass die Trennung der Fermente nach dieser Methode nicht möglich schien. Daher mussten andere Wege eingeschlagen werden: als solche kamen nur die modernen, insbesondere von Willstaetter,[12]) v. Euler[13] und Kuh[14]) — ausgearbeiteten Methoden der selektiven Adsorption und Elution der Fermente in Betracht. Diese Methoden sind höchst vielfältig und anpassungsfähig.

Die ersteren Versuche über Enzymadsorption stammt aus dem Jahre 1861; Ernst Brücke[15]) gelang es bei seiner Arbeit über die Lehre der Verdauung das Pepsin „mechanisch an kleine feste Körper zu binden", z. B. an Calciumphosphat, Schwefel oder an Cholesterin. In den folgenden Jahren bemühte sich Danilewsky[16]) im Kühneschen Laboratorium in Berlin, den Pankreassaft mittels Adsorption an Kollodium und nachfolgende Elution in seine Teilfermente zu zerlegen. Um eine pepsinfreie Chymosinlösung darzustellen, versuchte O. Hamarsten[17]) ein Verfahren der fraktionierten Adsorption auszuarbeiten, aber schliesslich gab er es auf, da ihm die Fermenttrennung auf anderem Wege, nämlich durch alkalische Inaktivierung des Pepsins gelang. Alle diese Versuche brachten somit keine nennenswerten Ergebnisse.

In den weiteren 50 Jahren hat die Forschung nicht mehr an die Adsorptionsmethoden angeknüpft. Die älteren Beobachtungen büssten an Glaubwürdigkeit oder Sicherheit ein, als man auf die Bedeutung der Azidität und auf die Wichtigkeit der Aktivatoren für die enzymatischen Systeme aufmerksam wurde.

Die Entwicklung der Adsorptionsmethoden gewann einen besonderen Antrieb durch die Untersuchungen von L. Michaelis und M. Ehrenreich[18]): „Ueber die Adsorptionsanalyse der

---

12) Willstaetter. B. 55, 3601 (1922)
13) v. Euler. Die Chemie der Enzyme, II. Autl.
14) C. Oppenheimer. Die Fermente und ihre Wirkungen, IV. S. 112 (1924).
15) Ernst Brücke. Sitzungen math. naturw. Klasse d. K. Acad. d. Wiss. Wien, 43, 601 (1861).
16) Virchows Archiv, 25, 279 (1862).
17) R. Malys. Jahresber. über d. Forschung d. Tierchemie, 2. Bd. (1872); 118 (1874).
18) Bio. Z. 10, 283 (1908); L. Michaelis, Bio. Z. 7, 488 (1907/08) Bio. Z. 12, 26 (1908).

Fermente". Michaelis und Ehrenreich untersuchten die unspezifische Adsorption der Enzyme und zwar die elektrochemische; sie wählten solche Fälle der Adsorption aus, in denen die entgegengesetzte elektrische Ladung von Adsorbens und Adsorbendum massgebend ist. Dabei wurde festgestellt, dass alle Substanzen, die durch Kaolin adsorbiert werden können, Basen sein müssen, dass aber die, welche durch Tonerde adsorbiert werden, Säuren sind. Diese Befunde gelten indessen nicht für die Enzyme selbst, sondern für ihre Aggregate mit begleitenden Stoffen[19]). Das Adsorptionsverhalten, sofern es mit sehr unreinen Enzymlösungen ausgeführt wird, sagt über die Natur eines Fermentes nichts aus, sondern es lässt nur erkennen, ob in dem aus einem Ferment und seinen jeweiligen Begleitstoffen gebildeten Additions- oder Adsorptionsprodukt, die Säure- oder Basennatur überwiegt.

Verschiedene Enzyme zeigen zugleich saure und basische Eigenschaften mit kleinen Abstufungen. Das wahre Adsorptionsverhalten eines Enzyms wird erst in höherem Reinheitsgrade erkennbar. Man kann das Adsorptionsverhalten eines Enzyms in gewissem Sinne auch durch Zugabe passender Reagentien beeinflussen. So gelang es Willstaetter[20]) durch Zusatz von 50%igem Alkohol zu einer Lösung der Pankreas-Amylase ihre Adsorptionsfähigkeit durch Tonerde zu steigern; wahrscheinlich wird dabei der saure Charakter der mit der Amylase assoziierten amphoteren Stoffe entwickelt und damit die Adsorption an Tonerde begünstigt.

Wenn es sich in den früheren Arbeiten um die Trennung spezifisch ganz verschiedener Fermente handelte, wie die von Pankreas-Amylase von Trypsin und Lipase, stellte ich mir zur Aufgabe, Adsorptionsunterschiede gewissermassen analoger Enzyme herauszufinden. Da für diesen Fall keine Gesetzmässigkeiten aufgestellt worden sind, musste ich empirisch vorgehen.

Ich behandelte den Malzauszug bei dem Aziditätsoptimum seiner Fermente, ca. $p_H = 5$, mit kolloidalem Eisenhydroxyd. Während die Cellobiase gar nicht mitgerissen wurde, zeigte die Amylase in den ersten sechs Stunden eine deutliche Schwächung ihrer Wirkung, die nach 24 Stunden wieder aufgehoben war. Dieses eigenartige Verhalten der Amylase, welches eine besondere Untersuchung verdient, kontrollierte ich sowohl reduktrometrisch, nach Bertrand, als auch kolori-

---

19) R. Willstaetter u. Racke. A. 425, 55 (1920/21).
20) R. Willstaetter u. E. Waldschmidt-Leitz, B. 54, 2988 (1921).

metrisch nach der Wohlgemuthschen[21]) Jodmethode, die beide das gleiche Ergebnis hatten. (Tabelle 3 u. 5).

Ein Versuch mit Kaolin, das in einem Mengenverhältnis von 1:10 zur Malzlösung gegeben wurde, zeigte die vollständige Adsorption der Cellobiase und Mannanase aus der Malzlösung; die Amylase verhielt sich ebenso wie bei der Eisenhydroxydadsorption. (Tabelle 4). Die Verwendung von Kaolin schien somit aussichtsreicher zu sein: ich hoffte, mittels Elution aus dem Adsorbat, die Cellobiase und Mannanase zu gewinnen, aber die Elutionsversuche bei p_H 7 und p_H 8 führten zu keinem befriedigenden Ergebnis.

Es bestand eine Möglichkeit durch Variation der Kaolinmenge und der Azidität eine Trennung der Fermente zu erzielen. Bei p_H 3 wurden alle Fermente auch mit kleinen Mengen Kaolin adsorbiert, während bei $p_H = 8$ eine teilweise Trennung gelang. Durch Zugabe von 50% Alkohol zum Malzauszuge bei der Adsorption liess sich eine beinahe vollständige Trennung der Mannanase von der Mannobiase erreichen, von denen nur die zweite in das Adsorbat ging, während die Cellobiase neben der Lichenase wirksam geblieben war. (Tabelle 8).

Mit Hilfe eines so vorbehandelten Malzauszuges konnte die Spaltung des Salepmannans zur Mannobiose wiederholt werden. Andererseits beweist das Ergebnis, dass die Mannobiase und die Cellobiase trotz der zwischen Lichenin und Mannan bestehenden Analogien ausser dem gemeinsamen optimalen p_H nichts miteinander zu tun haben.

Im Anschluss an meine Versuche über Malzfermente bestimmte ich auch den Verlauf der Aktivitäts-p_H-kurve der kürzlich von H. Pringsheim[22]) und J. Leibowitz[23]) entdeckten Malzmaltase. Auch das Optimum dieses Fermentes wurde analog den anderen untersuchten Malzenzyme zu $p_H = 5$ gefunden.

---

21) Bio. Z. Bd. 9, 1 (1908); Grundriss der Fermentmethoden, S. 30, Berlin (1913).
22) H. Pringsheim und Leibowitz. Bio. Z. 161, 456 (1925);
23) J. Leibowitz, H. 1925 im Druck.

Experimenteller Teil.

Zur Darstellung des Mannans wurden 100 g. der gepulverten Tubera Salep in 15 l. Wasser aufgeschlämmt und 2-3 Tage unter häufigem Umschütteln bei gewöhnlicher Temperatur stehen gelassen. Dann zentrifugierte ich ab und dampfte im Vakuum bis zu einem Volumen von 3 l. ein. Bei Zugabe von $^1/_3$ Volumen Alkohol fiel ein weisser voluminöser Niederschlag aus, den ich nach dem Zentrifugieren und Pressen mehrere Tage in absolutem Alkohol stehen liess. Hierauf presste ich ihn stark aus, liess ihn in einem Gemisch von Alkohol und Aether mehrere Tage stehen, filtrierte ab und trocknete im Vakuumexsikkator.

Die Prüfung auf Aschegehalt der gewonnenen Substanz ergab folgende Werte:

verascht: 0,5453 g Substanz
Asche: 0,0059 g = 1,08%

Das Mannan zeigt in wässriger Lösung keine optische Aktivität.

Säurehydrolyse des Mannans.

Ehe zur fermentativen Spaltung geschritten wurde, bestimmte ich durch Hydrolyse den Gehalt des Mannans an Mannose. Dazu versetzte ich 10 ccm einer Lösung, die 0,0998 g Salepmannan enthielt, mit 1,6 ccm 2,5% HCl und erhitzte zwei Stunden im Wasserbade. Die Zuckerbestimmung nach Bertrand ergab:
165,7 mg Cu = 0,091 mg Mannose = ensprechend 0,082 g Mannan oder 82% des Rohmannans.

Drehung des Hydrolysats:

$$[\alpha]_D^{23} = \frac{+\ 0{,}21^\circ \times 12{,}116}{1 \times 0{,}1602 \times 1{,}0152} = +15{,}6^\circ$$

Die Drehung der Mannose = + 14° gefunden worden.

Ferment - Spaltungs - Versuche.

Emulsin.

40 ccm 0,89% Mannanlösung
10 ccm Citratpuffer p_H = 6,0 bei 37°
Spur Emulsin

Titration mit je 5 ccm Lösung

t (Stunden)	mg Cu	% Mannose
0	—	—
24	5,7	7
48	7,6	10
72	8,5	11
96	9,5	12

Pankreatin.

40 ccm 0,89% Mannanlösung
10 ccm Citratpuffer bei 37°
Spur Pankreatin

Titration mit je 5 ccm der Lösung

t (Stunden)	mg Cu	% Mannose
0	—	—
24	6,9	8
48	10,7	13
72	15,9	20
96	17,8	23

Gealterter Malzauszug.

a) 2 Monate alter Malzauszug.

0,9987 g Salepmannan wurden in 90 ccm Wasser und 10 ccm Citrat gelöst.

25 ccm dieser Lösung
25 ccm 2 Monate alten Malzauszugs bei 37°
50 ccm Wasser

Titration mit je 10 ccm.

t (Stunden)	mg Cu	% Mannose
0	2,2	–
24	16,5	30
48	33,0	63
72	40,2	72
96	44,3	81

Drehung:

$$[\alpha]_D^{23} = \frac{+\ 0{,}035^\circ \times 5{,}0085}{1 \times 0{,}0114 \times 1{,}002} = +\ 15^\circ$$

Da im Mannan etwa 91% Mannose nachweisbar sind, kann diese Spaltung als nahezu quantitativ angesehen werden.

b) 6 Monate alter Malzauszug.

Ein Versuch, der unter denselben Bedingungen mit einem 6 Monate alten Malzauszug angestellt wurde, verlief folgendermassen:

Titration mit je 10 ccm.

t (Stunden)	mg Cu
0	2,2
24	14,7
48	20,2
72	22,1
96	22,2

Dle Reduktionskraft des gebildeten Zuckers ist also halb so gross wie die der Mannose.

Mannobiosephenylhydrazon

Die Lösung wurde im Vakuum stark eingedampft, das Hydrazon durch Zusatz von essigsaurem Phenylhydrazin in der Kälte ausgefällt und aus pyridinhaltigem Wasser umkristallisiert. Schmelzpunkt 199° (unkorr.).

0,1980 g Subst.: 11,7 ccm N (757 mm, 20,5°)
0,0818 g Subst.: 0,1525 mg CO_2 0,0496 mg H_2O
C_{18} H_{28} O_{10} N_2 Ber. 50,0% C. 6,5% N. 6,5% H.
Gef. 50,8% C. 6,6% N. 6,7% H.

Mannobiose.

Zur Gewinnung des neuen Zuckers löste ich sein Phenylhydrazon in warmem Wasser und versetzte die Lösung unter Umschütteln mit einigen Tropfen Benzaldehyd. Der Niederschlag des Benzalazins wurde abfiltriert und das Filtrat ausgeäthert. Darauf dampfte ich die entfärbte wässrige Lösung im Vakuum zum Sirup ein, der beim Stehen im Exsikkator sternenförmig gelagerte Prismen ausschied.

Spezifische Drehung im Wasser:

$$[\alpha]_D^{23} = \frac{+ 0{,}26^\circ \times 6{,}1302}{1 \times 0{,}1242} = + 12{,}8^\circ$$

Bestimmung des Aziditätsoptimums der Mannanase.

15 ccm 0,35% Mannanlösung
10 ccm Puffer, 10 ccm 4 Monate alter Malzauszug
bei 37°

TABELLE 1.

Titrationen nach Willstaetter und Schudel[24]) mit je 5 ccm der Lösung.

Zeit in Stunden	p_H — 4,8		5,2		5,6	
	ccm	%	ccm	%	ccm	%
0	0,15	—	0,15	—	0,15	—
24	0,25	11	0,30	17	0,25	11
48	0,30	17	0,40	28	0,30	17
96	0,40	28	0,45	34	0,35	23
120	0,65	57	0,65	57	0,35	23

Zeit in Stunden	p_H — 6		6,5		7	
	ccm	%	ccm	%	ccm	%*
0	0,15	—	0,15	—	0,15	—
24	0,20	6	0,20	6	0,20	6
48	0,25	11	0,25	11	0,20	6
96	0,25	11	0,25	11	0,20	6
120	0,35	23	0,25	11	0,25	11

Alterungsversuche.

25 ccm Malzauszug + 10 ccm Puffer wurden 18 Tage bei 37° belassen, nach dem Altern durch Zugabe entsprechender Puffer auf p_H — 5 gebracht und auf 50 ccm aufgefüllt.

Angewandt:

bei 37° 15 ccm 0,75% Mannan-, Cellobiose-Stärkelösung
15 ccm gealterten Malzauszug

TABELLE 2a.

Titrationen mit Jod nach Willstätter und Schudel[2]) mit je 5 ccm.

Zeit in Stunden	Mannan									
	p_H — 3		4		5		6		7	
	ccm	%*	ccm	%	ccm	%	ccm	%	ccm	%
0	0,50	—	0,50	—	0,60	5	0,55	2,5	0,55	2,5
24	0,50	—	0,50	—	0,85	15	1,10	26	0,75	11
48	0,50	—	0,50	—	1,25	33	1,25	33	0,95	20
72	0,50	—	0,50	—	1,40	39	1,25	33	0,95	20

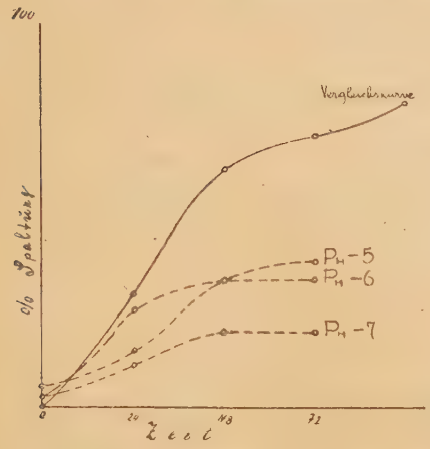
*) Spaltung auf Mannose berechnet.

---

[24]) R. Willstaetter u. G. Schudel. B. 51, 780 (1918).

*) Spaltung berechnet auf Mannose.

Die Kurven der Spaltungen verlaufen folgendermassen:



Zum Vergleich stelle ich die Kurve (∼) der Spaltung eines frischen Malzauszuges bei dem Aziditätsoptimum der Mannase, p_H — 5auf.

Wie zu sehen ist, ist die Wirkung der Mannanase bei der Alterung bei verschiedener Azidität abgeschwächt worden, am stärksten ist ihre Wirkung noch bei p_H — 5. Bei p_H — 3 und 4 ist das Ferment vollständig zerstört worden, so dass überhaupt keine Spaltung festzustellen ist.

TABELLE 2b.

Zeit in Stunden	Cellobiose									
	p_H = 3		4		5		6		7	
	ccm	%	ccm	%	ccm	%	ccm	%	ccm	%
0	1,60	—	1,60	—	1,65	5	1,65	5	1,60	—
24	1,60	—	1,60	-	2,20	55	2,40	73	2,40	73
48	1,60	—	1,60	—	2,50	82	2,45	78	2,40	73
72	1,60	—	1,60	—	2,50	82	2,50	82	2,50	82

Auch die Cellobiase wurde beim Altern bei p_H 3 und 4 zerstört; bei p_H - 5, sowie 6 und 7 ist sie allerdings mehr intakt geblieben als die Mannanase. Die Erreichung meines Zieles, einen Malzauszug zu erhalten, in dem die Mannanase ohne die Gegenwart der Cellobiase wirkungsfähig wäre, war damit vereitelt.

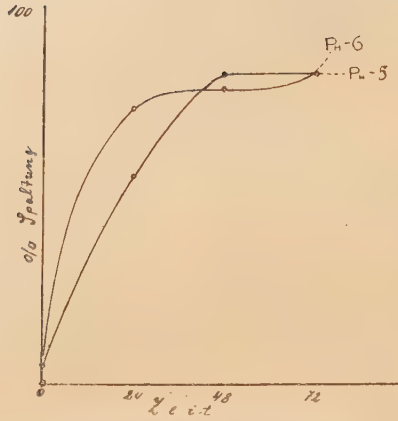
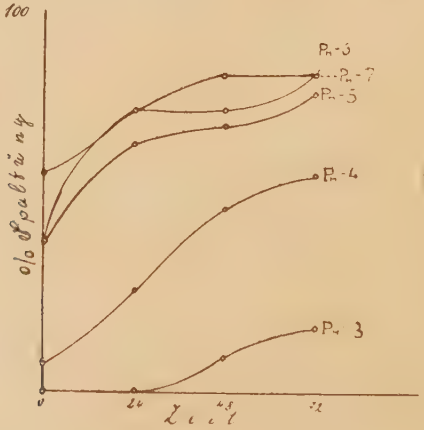


TABELLE 2c.

Zeit in Stunden	Stärke									
	$p_H - 3$		4		5		6		7	
	ccm	%	ccm	%	ccm	%	ccm	%	ccm	%
0	0,50	—	0,58	7	0,95*)	39	0,95*)	39	1,15*)	57
24	0,50	—	0,80	26	1,25	65	1,35	74	1,35	74
48	0,60	9	1,05	48	1,30	70	1,35	74	1,45	83
72	0,70	17	1,15	57	1,40	78	1,45	83	1,45	83

*) Nach 1 bis 2 Minuten.

Bemerkenswert ist in dieser Tabelle das rasche Ansteigen der Kurven am Anfang der Einwirkung. Wie zu erwarten war ist die Amylase bei p_H — 3 und 4 in ihrer Wirkung geschwächt worden, während das Ferment bei p_H — 7 am wenigsten geschwächt wurde.



Adsorptionsversuche.

1. Versuch.

Adsorption mit kolloidalem Eisenhydroxyd.

20 ccm frischen Malzauszug
9 ccm Puffer p_H — 5
1 ccm $Fe(OH)_3$
} umgeschüttelt und abfiltriert.

Zum Vergleich.

25 ccm Cellobiose oder Stärke 0,7%
10 ccm Puffer p_H — 5
7,5 ccm Wasser
7,5 ccm behandelten Malzauszug

25 ccm Cellobiose oder Stärke 0,7%
10 ccm Puffer p_H — 5
10 ccm Wasser
5 ccm unbehandelten Malzauszug

bei 37°.

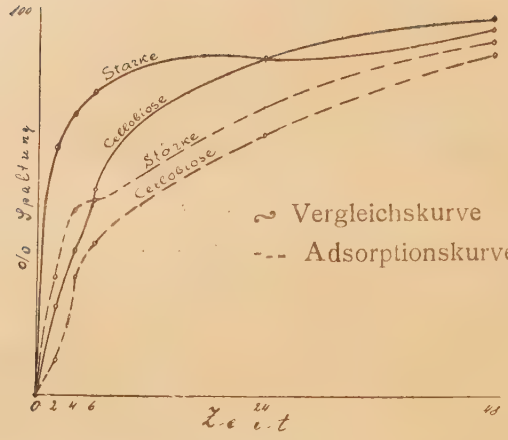
Es wurde darauf geachtet, dass das Verhältnis vom Malzauszug zum Substrat in den Adsorptions-, und in Vergleichsversuchen dasselbe bleiben soll.

TABELLE 3.

Titration nach Bertrand mit je 5 ccm der Lösung.

t (Stunden)	Cellobiose*)		Stärke**)		Cellobiose		Stärke	
	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%
0	25,45	—	—	—	25,45	—	—	—
2	26,45	9	5,72	31	28,03	23	13,35	65
4	28,98	31	10,17	49	29,26	34	15,25	74
6	29,94	40	10,50	51	31,16	52	16,53	80
24	33,44	69	15,58	76	35,62	89	18,45	89
48	35,78	90	90,31	94	36,78	100	20,05	97

*) Spaltung auf Glucose berechnet.
**) Spaltung auf Maltose berechnet.



2. Versuch.

Adsorption im Verhältnis von 10% zur Malzlösung mit Kaolin.

15 ccm Malzauszug
7,5 ccm Puffer p_H — 5
} 2 g Kaolin, 3/4 Std. stehen gelassen, häufig umgeschüttelt und abfiltriert.

25 ccm Cellobiose-Stärke-Mannan (0,7%)
10 ccm Puffer p_H — 5
7,5 ccm Wasser
7,5 ccm des behandelten Malzauszuges
bei 37°

TABELLE 4.

Titrationen mit je 5 ccm Lösung.

t (Stunden)	Cellobiose		Stärke		Mannan*)	
	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%
0	25,45	—	—	—	—	—
2	25,45	—	3,81	20	0,10	5
4	25,45	—	5,09	25	0,10	5
6	25,45	—	7,63	37	0,10	5
24	25,45	—	16,2	78	0,10	5
48	25,45	—	19,72	96	0,10	5

Cellobiase und Mannanase wurden vollständig adsorbiert. Das Verhalten der Amylase untersuchte ich noch nach der Wohlgemuthschen Methode.

*) Titriert nach Willstätter u. Schudel mit Jod, da der ungespaltene Teil des Mannans durch die Natronlauge der Fehlingschen Lösung bei der Bertrand-Methode ausgefällt wird, was die Bestimmung erschwert und ungenau macht.

Zur näheren Untersuchung des Verhaltens der Amylase nach der Adsorption verfolgte ich die Spaltung nach der Methode von Wohlgemuth mit Jod: Dazu beschickte ich eine Reihe Reagensgläser mit absteigenden Mengen der zu untersuchenden Fermentlösung (0,16, 0,25, 0,4, 0,64, 1,0 ccm des gewöhnlichen Malzauszuges und, nachdem ich 10 ccm dieses Malzauszuges in Gegenwart von 5 ccm Pufferlösung von p_H — 5 mit Kaolin behandelt hatte, davon entsprechend 0,24, 0,37, 0,6, 0,92, 1,5 ccm).

Ich fügte dann zu jedem Röhrchen je 5 ccm einer 0,7% Stärkelösung und stellte jedes Röhrchen sofort in ein Gefäss mit Eiswasser, um die Spaltung vorläufig zu verhindern. Wenn dann alle Gläschen in dieser Weise vorbereitet waren, wurden sie nach dem Brutraum gebracht, wo sie einer Temperatur von 37° ausgesetzt waren. Nach zwei Stunden übertrug ich sie wieder in ein Gefäss mit Eiswasser und liess sie darin eine kurze Zeit stehen. Dann füllte ich alle Reagensgläser bis fingerbreit vom Rande mit Wasser auf, setzte zu jedem Gläschen je ein Tropfen einer n/10 Jodlösung und schüttelte um.

In einer anderen Reihe Reagensgläser dehnte ich diesen Versuch auf 6 und 22 Stunden aus.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind folgende:

TABELLE 5.

Gewöhnlicher Malzauszug.				Malzauszug nach Adsorption mit Kaolin			
ccm	2 St.	6 St.	22 St.	ccm	2 St.	6 St.	22 St.
0,16	—	violett	hellbraun	0,24*)	—	—	—
0,25	—	violett	„	0,37*)	—	—	—
0,4	hellblau	orange	„	0,6*)	—	—	violett
0,64	hellblau-orange	hellblau-orange	„	0,92*)	—	—	dunkel-braun
1,0	hell-orange	hell-orange	„	1,5*)	—	—	hell-braun

3. Versuch,

Elutionsversuche mit Phosphatpuffer von p_H — 8.

Das abfiltrierte Adsorbat des Versuches 2 wurde mit 12,5 ccm Phosphatpuffer p_H — 8 20 Minuten eluiert und

*) Entspricht der Menge bei gewöhnlichem Malzauszuge wegen Verdünnung mit Puffer.

dann durch Zugabe von 12,5 ccm p_H — 2 auf p_H — 5 gebracht.

10 ccm Mannan — Collobiose — Stärkelösung (0,65%)
5 ccm Eluat
5 ccm Wasser
bei 37°.

TABELLE 6.

Titrationen mit Jod je 5 ccm Lösung.

t (Stunden)	Mannan		Cellobiose		Stärke	
	ccm	%	ccm	%	ccm	%
0	—	—	0,90	—	—	—
24	—	—	0,90	—	0,85	84
48	—	—	0,90	—	1,00	100

Eluiert wurde nur die Amylase; eine Aussicht zur Trennung von Cellobiase und Mannanase war damit nicht gegeben.

4. Versuch.

Ferment A: 25 ccm Malzauszug, 12,5 ccm Puffer von p_H — 8, ½ Stunde adsorbiert an 0,1 g Kaolin, nach der Adsorption abzentrifugiert und auf p_H — 5 durch Zugabe von 12,5 ccm Puffer von p_H — 2 umgestellt.

Ferment B: 25 ccm Malzauszug, 12,5 ccm Puffer von p_H — 5, behandelt ebenso wie Ferment A. 12,5 ccm Wasser (zugegeben nach der Adsorption).

Ferment C: 25 ccm Malzauszug, 12,5 ccm p_H — 3, behandelt ebenso wie Ferment A. Umgestellt mit 12,5 ccm p_H — 7.

15 ccm 0,6% Mannan- oder Cellobioselösung 5 ccm Fermentlösung (A oder B oder C), ccm Wasser, bei 37°.

TABELLE 7.

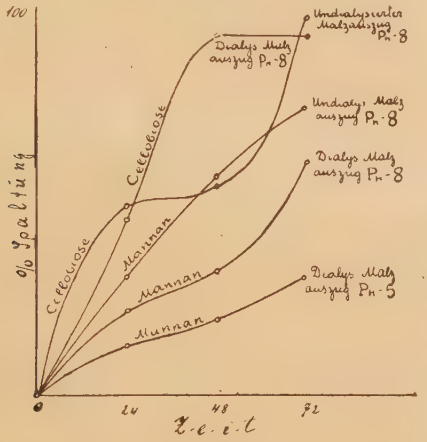
Titrationen mit Jod je 5 ccm.

Zeit in Stunden	Undialysierter Malzauszug*)							
	Mannan**)				Gellobiose***)			
	p_H = 3		8		3		8	
	ccm	%	ccm	%	ccm	%	ccm	%
0	2,9	—	2,9	—	3,9	—	3,9	—
24	3,0	4	3,7	31	3,9	—	4,4	50
48	3,0	4	4,5	58	3,9	—	4,5	55
72	3,0	4	5,0	76	3,9	—	5,0	100

***) Tabellen-Fussnote Umseitig.

Zeit	Dialysierter Malzauszug*)											
	Mannan**)						Cellobiose***)					
	$p_H = 3$		5		8		3		5		8	
	ccm	%	ccm	%	ccm	%	ccm	%	ccm	%	ccm	%
0	—	—	—	—	—	—	0,95	—	0,95	—	0,95	—
24	0,15	6	0,35	13	0,6	22	0,95	—	1,35	46	1,35	46
48	0,15	6	0,55	20	0,9	33	0,95	—	1,85	95	1,85	95
72	0,15	6	0,85	31	1,7	62	0,95	—	1,85	95	1,85	95

*) Titrationen mit je 5 ccm nach Willstätter und Schudel. — **) Die Spaltung wurde auf Mannose berechnet. — ***) Die Menge Glucose neben der ungespaltenen Cellobiose wurde durch empirische Rechnung festgestellt.



5. Versuch.

Adsorptionsversuche in Gegenwart von Alkohol.

15 ccm Malzauszug, 10 ccm Alkohol 50%, 5 ccm Puffer von p_H — 5 oder 7 oder 8, $^1/_2$ Stunde adsorbiert an 0,1 g Kaolin, nach der Adsorption überzentrifugiert und auf p_H — 5 durch Zugabe von 5 ccm Puffer von p_H — 5, oder 3 oder 2 umgestellt.

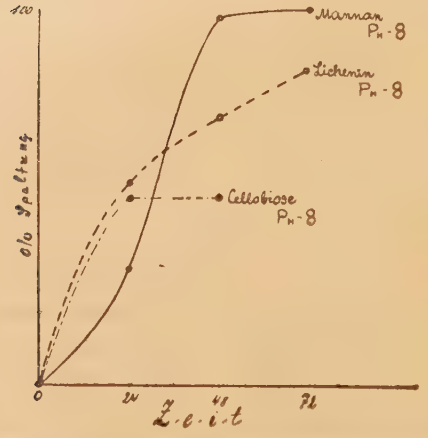
10 ccm 0,3% Mannan- oder 0,5% Cellobiose- oder 0,2% Licheninlösung, 10 ccm des bei Alkohol behandelten Malzauszuges aufgestellt bei 37°.

TABELLE 8.

Titration mit je 5 ccm nach Bertrand*).

Zeit	Mannan**)						Cellobiose***)						Lichenin †)					
	$p_H = 5$		7		8		5		7		8		5		7		8	
	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%	mg Cu	%
0	—	—	—	—	—	—	18,13	—	18,13	—	18,13	—	—	—	—	—	—	—
24	2,36	29	2,54	31	2,54	31	22,90	56	22,90	56	22,26	50	—	—	5,08	67	4,13	54
48	3,27	40	6,36	78	7,95	98	23,71	62	22,90	56	22,26	50	—	—	6,36	84	5,40	71
72	3,27	40	7,95	98	8,22	100	—	—	—	—	—	—	—	—	6,36	84	6,36	84

*) Wegen der Gegenwart von Alkohol konnte nicht mit Jod titriert werden — **) Da bei diesem Versuche die Clucosaozonreaktion negativ ausfiel, berechneten wir die Spaltung des Mannans auf Mannobiose unter der Voraussetzung, dass Mannobiose halb so stark Fehlingsche Lösung reduziert als Mannose. — ***) Die Menge Clucose neben der ungespaltenen Cellobiose wurde durch empirische Rechnung festgestellt. — †) Die Abwesenheit grösserer Mengen von Glucose im Hydrolysat wurde durch die Nichtbildung des Glucosazons wahrscheinlich gemacht.



Bei diesem Versuche ist der Verlauf der Kurve der Mannanspaltung intensiver als der der Cellobiose, so dass damit mein Ziel eine Abtrennung der Disaccharase bei gleichzeitiger Erhaltung der Mannan-Polyase, besser als in vorherigen Versuchen erreicht worden ist.

Das Mannosephenylhydrazon wurde analog wie beim gealterten Malzauszug beschrieben, hier mit des durch Adsorption von der Mannobiase getrennten Malzes gewonnen und hat folgende Analyse:

Mikro-Kjeldahl-Bestimmung:

$C_{18}H_{28}O_{10}N_2$: Ber. 6,5% N. 0,0105 g Substanz verbrauchten 2,61 ccm n/50 H_2SO_4 entsprechend 6,8% N.

TABELLE 9.

Umstellung der Pufferlösungen.

Angew. Puffer*)		Zusatz v. $p_H = 7$**)	Ergeb.	Angew. Puffer*)		Zusatz v. $p_H = 6$**)	Ergeb.
p_H	ccm	ccm	p_H =	p_H	ccm	ccm	p_H =
1	1,0	5,0	6,6	1	1	5	3,0
1	1,5	4,5	6,2	2	1	5	4,3
1	4,4	1,6	5,8	3	1	5	4,9
1	4,3	1,7	5,4	4	5	1	4,4
1	4,2	1,8	4,3	4	4	2	4,5
2	2,0	4,0	5,8	4	3	3	4,9
2	2,5	3,5	5,0				
3	5,0	1,0	4,0			$p_H = 8$**)	
3	4,0	2,0	4,4	2	3	3	5,0
3	3,0	3,0	4,9	1,6	4	2	3,0
4	5,0	1,0	4,5				
4	4,0	2,0	4,7				
4	3,0	3,0	5,2				
4	3,5	2,5	5,0				

*) n/10-HCl bzw. Citrat + HCl.
**) Phosphat.

TABELLE 10.

Bestimmung des Aziditätsoptimums der Malzmaltase[1])

5 ccm 2,5% Maltoselösung
10 ccm Puffer (Citrat p_H — 3 bis 5
bei 37°. Phosphat p_H — 5,5 bis 7.5)
5 ccm Wasser
5 ccm Malzauszug

Titrationen nach Bertrand mit je 5 ccm.

p_H =	3,0		3,5		4,0		4,5		5,0	
Zeit Std.	Cu mg	Spalt. %	Cu mg	Spalt. %	Cu mg	Spalt. %	Cu mg	Spalt. %	Cu mg	Spalt. %
0	26,1	—	26,1	—	26,1	—	26,1	—	26,1	—
5	26,9	Spuren	27,7	6	30,5	20	30,6	20	30,6	20
24	27,0	„	28,1	8	37,8	50	40,1	55	42,0	60

p_H =	5,5		6,0		6,5		7,0		7,5	
Zeit Std.	Cu mg	Spalt. %	Cu mg	Spalt. %	Cu mg	Spalt. %	Cu mg	Spalt. %	Cu mg	Spalt. %
0	26,1	—	26,1	—	26,1	—	26,1	—	26,1	—
5	28,7	10	28,3	10	28,0	10	28,0	10	—	—
24	42,0	60	39,1	55	36.6	45	36,5	45	26,8	Spuren

[1]) Siehe Seite 6.

An dieser Stelle möchte ich meinen besten Dank meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Hans Pringsheim, aussprechen für die Ueberlassung dieser Arbeit und für die wertvollen Anweisungen, die mir die Ausführung dieser Arbeiten erleichterten.

Lebenslauf.

Am 5. April 1900 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Wulf Genin zu Riga geboren. Ich besuchte von 1912 bis 1915 das Rigasche russische Gymnasium. Infolge des Krieges zogen meine Eltern nach Witebsk, wo ich meine Schulbildung am dortigen Gymnasium bis 1918 fortsetzte. Als die Verhältnisse in meiner Heimatstadt sich wieder ordneten, kehrten meine Eltern im Herbst 1918 nach Riga zurück. Um diese Zeit wurde in Dorpat von der deutschen Okkupationsmacht die dortige Universität unter dem Rektorat von Prof. Dehio eröffnet. Ich liess mich als Hörer daselbst immatrikulieren. Im Juni 1919 legte ich mein Abitur an dem russischen Staatsgymnasium zu Riga ab.

Zu Anfang 1920 zog ich nach Deutschland, um mein Studium an der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin fortzusetzen. Im Mai 1921 wurde ich immatrikuliert. Als mein Hauptfach wählte ich Chemie.

Mein erstes Verbandsexamen legte ich im Juni 1923, das zweite im Dezember desselben Jahres ab. Meine Doktorarbeit führte ich unter Leitung von Herrn Professor Dr. Hans Pringsheim von Mai 1924 bis August 1925 aus.

Die Promotionsprüfung bestand ich am 4. März 1926.

BUCHDRUCKEREI
M. NAY
BERLIN-SCHÖNEBERG
EISENACHER STRASSE 28